

## USEFULNESS OF $\beta$ -HYDROXYBUTYRIC ACID, ACETOACETIC ACID AND ACETONE DETERMINATIONS IN BLOOD, URINE AND VITREOUS HUMOUR FOR NECROCHEMICAL DIAGNOSIS OF PREMORTAL METABOLIC DISORDERS\*

Grzegorz TERESIŃSKI, Grzegorz BUSZEWICZ, Roman MAĐRO

*Chair and Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Lublin*

**ABSTRACT:** Ketone bodies are a major energetic substrate for brain cells in cases of intracellular glucose deficiency caused by starvation or a lack of insulin. Their retention is intensified by renal failure. However, ketoacidosis may also result from ethanol-induced hypoglycaemia, particularly in chronic alcoholism and the accompanying undernourishment. Moreover, ketoacidosis increases in cases of intensified release of insulin-antagonistic hormones (e.g. in hypothermia), which leads to elevated levels of free fatty acids and their breakdown to acetyl-CoA – a ketogenic precursor. In the present studies levels of acetoacetate (Ac-Ac),  $\beta$ -hydroxybutyrate ( $\beta$ -HBA) and acetone (determined by means of headspace gas chromatography following thermal decarboxylation of Ac-Ac and enzymatic oxidation of  $\beta$ -HBA to acetone) were compared in blood, urine and vitreous humour collected during 36 *post mortem* examinations (mainly of chronic alcoholics and those who died in low temperatures with no diabetic history) to evaluate possibilities of ketone body use in post mortem diagnosis of premortal biochemical disorders. It was found that evaluation of degree of ketoacidosis intensification required determination of  $\beta$ -HBA – which in practice determines the levels of all ketone bodies. Free acetone concentrations determined additionally in blood ethanol tests using gas chromatography do not allow us to differentiate ketoacidosis from exogenic acetone intoxication but they may be used as a screening method to detect very advanced ketoacidosis. Autopsy blood was found to be the best medium to evaluate the severity of ketoacidosis in the premortal period. Furthermore, it was noted that determination of ketone bodies was a useful tool for explaining death mechanisms in chronic alcoholics and in cases in which hypothermia was suspected to be the cause of death.

**KEY WORDS:** Ketone bodies; *Post-mortem* diagnosis of hypoglycaemia; Chronic alcoholism; Alcohol-induced hypoglycaemia; Alcoholic ketoacidosis; Hypothermia.

*Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLIV, 2000, 55–75*

*Received 9 July 2000; accepted 6 September 2000*

---

\* Preliminary results of this work were presented during 16th Conference of Forensic Toxicologists, 6–7 May, 1999, Kazimierz Dolny.

## INTRODUCTION

Acetate (Ac-Ac),  $\beta$ -hydroxybutyrate ( $\beta$ -HBA) and acetone are usually called ketone bodies. The first stage of their creation takes place practically only in the liver (Figure 1) which contains the appropriate lyase releasing Ac-Ac from the product of condensation of acetylo Co-A (Ac-CoA). Ac-Ac can be reduced (with the contribution of dehydrogenase from  $\beta$ -HBA dependent on NAD) to  $\beta$ -HBA, which remains in balance with it depending on the cellular red-ox potential, especially on the NADH/NAD ratio. However, the decomposition of Ac-Ac to acetone is a non-enzymatic process which occurs spontaneously [11].

Ketone bodies naturally diffuse through cellular membranes and constitute an easily assimilable energetic substrate that gets oxidised preferentially before glucose and fatty acids. This feature assumes great importance in the state of starvation when tissues dependant on glucose (e.g. the brain) cover most of their energetic needs from oxidation of these compounds [11].

The physiological concentration of ketone bodies in blood is very small, usually below 0.2 mmol/l. Ketoacidosis, i.e. accumulation of bigger amounts of these compounds can result from their higher production in the liver or from a diminished use by peripheral tissues. The main cause of hyperketonemia is intracellular deficiency of glucose (absolute – caused by starvation, physical effort on an empty stomach, or relative – connected to a deficit of insulin that makes easier the transfer of glucose into cells of non-liver tissues) together with an increased decomposition of fatty acids and overproduction of Ac-CoA. An increased concentration of Ac-CoA can also be an effect of an improper diet (rich in fats and poor in carbohydrates), an excess of insulin antagonists (e.g. in hypothermia) or an imbalance of cellular red-ox potential (caused by e.g. a lack of the oxidised form of NAD required for utilisation of Ac-CoA in the citric acid cycle).

Ac-Ac and  $\beta$ -HBA anions that are created in excess are removed *via* the urine in the ionic form. Therefore, long-lasting ketoacidosis leads to disorders of the aqueous and electrolytic economy (i.e. the loss of sodium and potassium ions after the limits of effectiveness of the ammoniogenesis mechanism have been exceeded) as well as the acid-alkaline economy in the form of metabolic acidosis. However, one should remember that retention of ketone bodies can be intensified by renal failure, caused by, amongst other things, shock, ethylene glycol intoxication or dehydration as a result of e.g. persistent vomiting [1, 9, 11].

Although ethyl alcohol can be metabolised to Ac-CoA, it hardly contributes to production of ketone bodies, because oxidation of ethanol to acetate takes place almost entirely in the liver, whereas oxidation of acetate occurs mainly in tissues that do not have the ability to produce ketone bodies (Figure 1).

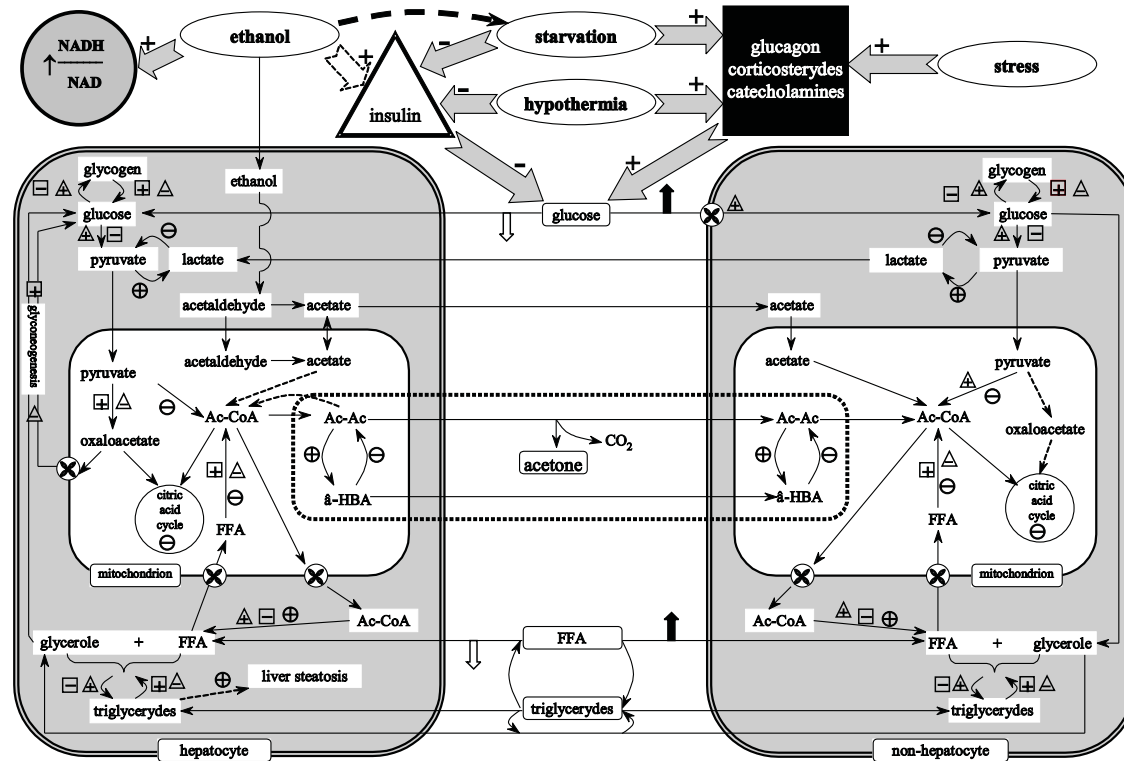


Fig. 1. Ketogenesis scheme (FFA – free fatty acids,  $\beta$ -HBA –  $\beta$ -hydroxybutyrate, Ac-Ac – acetoacete, Ac-CoA – acetyl-coenzyme A).

In single doses ethanol even acts against ketoacidosis (in diabetic hyperglycaemia as well) most probably as a result of stimulating secretion of insulin after burdening by glucose and inducing transportation of glucose into the cells. Consumption of ethanol, however, can lead to hypoglycaemia (usually occurring after a delay of several – or even tens of – hours) and so to secondary, sometimes even fatal, ketoacidosis. The late hypoglycaemic effect of ethanol can be explained by the change of the red-ox potential of the cell (i.e. the increase of the ratio of NADH:NAD) and the halting of gluconeogenesis (in spite of an excess of reduced NAD!) as a result of a lack of substrate for this reaction in the form of pyruvate (that gets reduced by the excess of NADH to lactate) and malnutrition accompanying a chronic consumption of alcohol [1, 2, 4, 8, 9, 11, 14].

An episode of hyperglycaemia prior to death can be revealed *post-mortem* by means of a simultaneous determination of the concentration of glucose and lactic acid, e.g. in the vitreous humour [12]. It is also possible to recognise diabetes *post-mortem* through examination of the level of glucosylated haemoglobin [1]. However, fast decomposition of glucose after death [3] means that premortal hypoglycaemia can be recognised only indirectly, e.g. by the determination of the concentration of ketone bodies.

From the point of view of the needs of forensic medicine, the concentration of ketone bodies in post-mortem material can serve as a marker for the above-mentioned biochemical disorders, which are usually not accompanied by macro- or microscopically recognisable anatomic changes. Thus, the aim of the current preliminary study was to determine the concentration of ketone bodies (acetone can be determined “by the way” when assessing the concentration of alcohol by the gas chromatography method) in the three most commonly used environments (i.e. in blood, urine and vitreous humour). Research was carried out on material collected from the corpses of people who chronically overused alcohol or were intoxicated with alcohol at the moment of death; this was justified by the above-mentioned influence of alcohol on ketogenesis and the relatively frequent cases of unexplained deaths among alcoholics [18]. Moreover, the subject of the study was material collected from the corpses of people whose death could have been a result of overcooling of the body. Presently existing possibilities of recognising that death was a result of freezing are very limited as observed changes are either weakly specific (ecchymosis in the mucous membrane of the stomach, histological features of the haemorrhagic pancreatic necrosis, cardiomyocyte necrosis or decreasing of the content of glycogen in hepatocytes), or represent only local action of low temperature (frostbites, violet coloured area in the vicinity of knees and olecranon as well as red coloured *post-mortem* livid blotches), and so they may not appear in cases of death from cooling at environmental temperatures close to zero or higher [7, 15].

## MATERIAL

The subject of the examinations was samples of blood, urine and vitreous humour collected from 36 corpses (33 men and 3 women aged 20–73, average age 44 years; with no diabetic history<sup>1</sup>) within 1–5 days after the death (3 days on average). Cases with recognised advanced autolytic changes or where decaying changes had begun were rejected. Corpses were preserved in a cold room at a temperature of about +4°C until the autopsy. The collected material was frozen.

## METHODS

For the analyses the following chemical compounds were used: NAD (free acid grade II, 98% purity), D- $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase, lactate dehydrogenase and sodium pyruvate by Boehringer. As the standards lithium acetoacetate, acetone and the set of  $\beta$ -HBA solutions by Sigma were utilised. Prior to use the pyruvate was purified by recrystallisation from methanol.

Acetone, Ac-Ac and  $\beta$ -HBA were determined by means of gas chromatography with the headspace technique according to the method worked out by Siegel et al. [17] and modified by Felby and Nielsen [5], using a gas chromatograph Fisons 8160 with an autosampler HS-800. In the studied samples firstly free acetone, then Ac-Ac (after its thermal decarboxylation to acetone) and  $\beta$ -HBA (after its enzymatic oxidation to Ac-Ac, followed by thermal decarboxylation to acetone) were determined. NADH produced during oxidation of  $\beta$ -HBA by D- $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase was successively recovered as a result of the reduction of pyruvate to lactate by lactate dehydrogenase.

## RESULTS AND DISCUSSION

The analytical procedure undertaken resulted from the nature of the material collected from the corpses. Due to a pronounced degree of haemolysis of blood it was impossible to apply a standard kit for determination of  $\beta$ -HBA by Sigma (which allows colorimetric determination of the concentration of NADH created as a result of oxidation of an equimolar quantity of acetoacetate) or other colorimetric methods based on the colour reaction of ace-

<sup>1</sup> The families of the dead gave this information.

tone or acetoacetate with various substances (e.g. sodium nitroprusside). For examinations of *post-mortem* material, the method of chemical oxidation of  $\beta$ -HBA with the use of potassium dichromate [19] was not suitable either, because in these conditions, isopropanol – created as a result of *post-mortem* processes – also gets oxidised to acetone.

The results of all determinations of the concentration of acetone, Ac-Ac and  $\beta$ -HBA are presented in Table I (in  $\mu\text{mol/l}$ ). This enables joint determination of the concentrations of all ketone bodies, as both  $\beta$ -HBA and acetone are created in equimolar quantities to Ac-Ac. Separate determination of concentrations of these substances, on the other hand, allowed us to exclude the possibility of exogenic acetone intoxication [19]. In this type of case, Ac-Ac and  $\beta$ -HBA are absent, as the decarboxylation of Ac-Ac is irreversible.

The obtained results (Table I) in most cases do not differ significantly from concentrations typical for healthy live persons, i.e. the concentration of  $\beta$ -HBA was below 0.3 mmol/l and the sum of acetone and Ac-Ac concentrations below 0.2 mmol/l [12]. However, they were much larger in some cases.

Further evaluation of the results of determinations of ketone concentrations in the three studied environments was carried out taking into account the results of autopsies (macro- and microscopic diagnosis), results of blood and urine analyses for the presence of ethanol and sometimes also further toxicological investigations. Moreover, the circumstances of death were taken into consideration – for this purpose all evidence included in archives (rendered accessible by the public prosecutor's offices) was analysed, as was information obtained from families of the dead persons, which allowed confirmation of chronic alcoholism and exclusion of full-symptomatic diabetes.

On the basis of the above determinations, the set of 36 examined cases was divided into the following groups and subgroups:

1. Deaths of persons who did not abuse alcohol chronically and nothing indicated the possibility of excessive cooling of the body; this group was further subdivided as follows:
  - a) cases in which only high concentrations of ethanol were detected (and possible disease changes in the circulatory system) ( $n = 7$ );
  - b) cases in which the death was caused by an injury or a sudden strangulation, when the victim was under the influence of alcohol ( $n = 6$ );
  - c) remaining cases of deaths of persons who were not under the influence of alcohol ( $n = 8$ ).
2. Deaths of persons who were chronic alcoholics<sup>2</sup>, and nothing indicated the possibility of excessive body cooling, including:

---

<sup>2</sup> For all cases classified into this group, fattening or cirrhosis of the liver was detected.

- a) cases in which only a large concentration of ethanol ( $> 4\%$ ) was detected ( $n = 3$ );
  - b) remaining cases of deaths ( $n = 6$ ).
3. Cases of death in which the circumstances of finding of the body and the results of the *post-mortem* examination showed the possibility of excessive body cooling ( $n = 6$ ).

An evaluation of the influence of the time which elapsed from death to the autopsy was omitted, because from earlier publications it was shown that the creation of ketone bodies in the course of *post-mortem* changes is not significant during the first 5 days after death [1].

Figure 2 shows the results of acetone, Ac-Ac and  $\beta$ -HBA analysis and the sums of the concentrations of all the ketone bodies in blood, urine and vitreous humour, taking into account the division of examined autopsy materials presented above. All cases were arranged in order within the groups and subgroups according to rising concentration of ketone bodies in blood. Moreover, the concentrations of ethanol in blood and urine are also shown in Figure 2.

The presented charts show that the best marker of ketoacidosis is the concentration of  $\beta$ -HBA, which in practice determines the level of ketone bodies. On the other hand, concentrations of acetone and especially Ac-Ac may be at low levels even if the concentration of  $\beta$ -HBA is significantly increased. Those commercial clinical tests that detect only Ac-Ac can, in some cases, give false negative results – so they have limited diagnostic value.

Detection of increased acetone concentration is possible “by the way” when analysing blood, urine and vitreous humour for the presence of ethanol. So, this routine procedure can at the same time be a screening examination showing an advanced degree of ketoacidosis; it also indicates the advisability of the determination of  $\beta$ -HBA level, because (as can be seen in Figure 2) a significant increase of acetone concentration (originating from metabolic processes) only accompanies a high  $\beta$ -HBA concentration.

The divergence between the concentration of  $\beta$ -HBA and the concentrations of Ac-Ac and acetone is especially pronounced (in particular in blood and vitreous humour) in the group of chronic alcoholics. This regularity should be explained by the change of the redox potential of liver cells which are “engaged” in the oxidation of ethanol (thus increasing the NADH/NAD ratio). The retention of Ac-Ac is then difficult as Ac-Ac gets converted to  $\beta$ -HBA, which in this situation can not be decarboxylated to acetone.

In cases of persons who died as the result of acute alcohol intoxication (even if they overused alcohol chronically) and in cases of sudden deaths (for other known reasons except hypothermia) of persons who were under the influence of alcohol but who were not alcoholics, the concentration of ketone bodies was low – close to the physiological norm of living persons. In cases of

TABLE I. THE RESULTS OF OF -HYDROXYBUTYRATE ( -HBA), ACETOACETE (AC-AC) AND ACETONE DETERMINATIONS IN BLOOD, URINE AND VITREOUS HUMOUR WITH REGARD TO AGE AND SEX OF THE VICTIMS, LIVER OR CARDIOVASCULAR PATHOLOGY AND DEATH CIRCUMSTANCES (C – LIVER CIRRHOSIS).

Case	Group	Sex, age	Alcoholism	Fatty liver	Coronary atherosclerosis	Hypothermia	Fatal injury	Fatal asphyxia	Hospitalisation	Blood				Vitreous humour				Urine			
										Ethanol [%]	Acetone [mol/l]	AC-AC [mol/l]	-HBA [mol/l]	Acetone [mol/l]	AC-AC [mol/l]	-HBA [mol/l]	Ethanol [%]	Acetone [mol/l]	AC-AC [mol/l]	-HBA [mol/l]	Ethanol [%]
1		22 ♂								3.7	161.2	24.3	122.5	158.2	3.6	98.9	5.0	158.3	25.2	53.2	
2		63 ♂		+	+++					3.3	155.8	85.4	67.0	146.6	76.0	271.7	3.7	148.1	76.9	51.7	
3		32 ♂								6.1	194.5	24.5	113.6	178.8	12.2	62.7	4.2	171.4	12.4	196.0	
4	1a	35 ♂								3.0	154.3	12.4	186.9	151.6	7.0	167.4	1.3	151.0	13.3	66.2	
5		21 ♂								5.2	140.2	83.1	189.2	139.4	72.2	134.7	5.8	140.8	74.0	5.0	
6		43 ♂			+				+	4.3	176.4	100.5	152.1	191.0	103.6	74.5	3.8	170.7	92.1	86.2	
7		37 ♂			++					5.6	175.4	91.7	173.4	172.3	82.2	41.3	6.1	162.0	72.5	1.8	
8		47 ♂			++		+			3.5	2.7	16.3	109.4	0.7	9.1	25.5	4.4	1.8	5.9	103.6	
9		29 ♂					+			4.4	148.2	82.7	49.7	139.4	76.6	26.6	3.2	139.1	73.2	33.7	
10		65 ♂		++	+		+			3.6	148.5	0.8	136.8	146.2	2.6	112.5	3.8	145.9	3.3	83.5	
11	1b	51 ♂			++		+			3.5	197.5	14.2	152.2	153.3	2.5	73.2	4.5	160.5	2.2	242.7	
12		25 ♂					+			1.8	160.5	9.9	239.1	152.9	9.7	91.4	3.0	166.0	101.2	266.4	
13		35 ♂					+			3.2	128.2	113.3	173.2	131.2	106.6	11.2	3.6	130.7	104.9	46.9	
14		70 ♂		C	++		+		+	0.0	20.2	21.5	84.6	10.4	17.6	81.0	0.0	20.2	16.7	68.2	
15		52 ♂			+		+			0.7	125.0	106.5	275.0	121.7	96.4	42.0	0.2	122.3	96.3	15.0	
16		63 ♂			+++					0.0	152.0	1.5	378.2	151.7	1.7	109.7	0.0	152.8	20.6	112.8	
17		40 ♂			+					0.0	172.7	13.5	495.2	165.0	0.2	266.5	0.0	170.3	141.7	60.3	
18	1c	65 ♂			+++		+			0.0	178.4	14.5	495.6	216.5	3.8	44.0	0.0	168.4	6.1	86.2	
19		73 ♂			+++					0.7	70.0	13.8	614.3	95.3	42.1	527.3	1.1	42.7	84.8	470.4	
20		34 ♀			+		+			0.0	216.3	97.2	500.2	176.3	88.4	153.5	0.0	167.9	77.8	93.3	
21		47 ♂			+		+			0.0	203.7	121.7	511.2	174.6	102.0	454.5	0.0	182.4	104.1	168.0	



TABLE I. THE RESULTS OF OF  $\beta$ -HYDROXYBUTYRATE ( $\beta$ -HBA), ACETOACETE (AC-AC) AND ACETONE DETERMINATIONS IN BLOOD, URINE AND VITREOUS HUMOUR WITH REGARD TO AGE AND SEX OF THE VICTIMS, LIVER OR CARDIOVASCULAR PATHOLOGY AND DEATH CIRCUMSTANCES (C – LIVER CIRRHOSIS); cont.

Case	Group	Sex, age	Alcoholism	Fatty liver	Coronary atherosclerosis	Hypothermia	Fatal injury	Fatal asphyxia	Hospitalisation	Blood				Vitreous humour				Urine							
										Ethanol	Acetone	AC-AC	$\beta$ -HBA	Ethanol	Acetone	AC-AC	$\beta$ -HBA	Ethanol	Acetone	AC-AC	$\beta$ -HBA	[ mol/l]		[ mol/l]	
																						[%]	[ mol/l]	[%]	[ mol/l]
22		47 ♂	+	++	+					5.7	14.0	17.3	79.3	4.0	47.8	46.3	5.9	5.0	6.3	109.8					
23	2a	47 ♂	+	+++	+					5.0	13.4	13.3	102.8	6.1	4.3	145.1	4.9	10.3	5.9	81.2					
24		47 ♂	+	+++	+					4.4	173.0	80.7	75.0	154.0	73.8	308.9	5.8	160.2	76.9	20.2					
25		39 ♀	+	+	+					2.4	196.7	72.9	506.6	194.7	17.8	529.8	2.6	196.5	43.2	436.6					
26		40 ♀	+	C	++					1.8	198.9	83.0	551.4	194.0	40.9	590.6	2.2	198.4	39.6	508.4					
27	2b	45 ♂	+	+++	+		+			3.1	198.2	122.4	559.9	192.1	48.1	525.8	4.0	192.2	26.5	499.2					
28		27 ♂	+	+	+					0.5	315.8	266.0	588.1	225.7	111.5	380.8	0.8	1165.6	337.5	666.2					
29		55 ♂	+	C	+++		+			4.8	229.8	96.2	1360.1	179.1	98.6	1215.6	1.9	204.3	88.5	244.3					
30		37 ♂	+	+	+					0.0	697.2	10.7	2368.5	739.6	46.2	551.4	0.0	448.5	78.2	4033.0					
31		35 ♂	+	C	+		+			4.8	186.3	20.6	43.3	175.0	5.6	41.4	6.8	167.0	6.7	286.0					
32		56 ♂		+	+		+			4.7	166.5	1.2	314.1	181.5	7.8	183.1	4.9	174.3	25.5	60.2					
33		20 ♂					+			4.1	201.5	85.3	510.2	193.3	250.3	267.7	5.2	195.7	31.0	481.1					
34	3	40 ♂	+	+			+			2.2	298.6	278.3	1249.0	206.9	61.2	712.6	3.4	966.6	241.3	1556.5					
35		35 ♂		+			+			0.6	150.6	20.0	3861.9	32.5	19.8	2757.7	1.0	1556.9	40.7	20431.0					
36		56 ♂	+	+	++		+			0.0	1948.9	1447.6	3810.6	1004.6	614.4	567.0	0.0	3533.1	1828.8	7091.6					

Fig. 2. A comparison of  $\beta$ -hydroxybutyrate ( $\beta$ -HBA), acetoacete (Ac-Ac) and acetone concentrations in blood, urine and vitreous humour in 36 examined cases.

acute ethanol intoxication increase of ketogenesis does not occur since the liver cells, which are “engaged” in the utilisation of ethanol, do not accumulate larger amounts of Ac-CoA, which constitutes the substrate for

ketogenesis (the increase of the NADH/NAD ratio during the oxidation of ethanol hampers  $\beta$ -oxidation of fatty acids and the acetate created is activated to Ac-CoA mainly in non-liver tissues, which have no ability to produce ketone bodies). Only prolonged ethanol intoxication together with a decrease in the concentration of glucose in blood (as a result of reactive hypoglycaemia caused by ethanol, the hampering of gluconeogenesis due to lactoacidosis or (and) a lack of meals containing carbohydrates) can lead to hyperketonemia (and ketoacidosis) as a result of the activation of insulin-antagonistic hormones, intensified decomposition of triglycerides and an increase in the concentration of free fatty acids and Ac-CoA, which can not enter the citric acid cycle (among others due to a lack of oxalatoacetate arising during the decomposition of glucose)<sup>3</sup>.

However, the largest concentrations of ketone bodies in the studied group occurred in cases where ethanol was not detected in the body fluids and the circumstances showed that the cause of death could have been excessive cooling of the organism. This attests to the fact that a high concentration of ketone bodies can be treated as a diagnostic test for death caused by hypothermia<sup>4</sup>. Hypothermia leads (similarly to other stressors) to intensive liberation of insulin-antagonistic hormones (at the beginning mainly catecholamines, later glucagon and corticosteroids) that intensify the breakdown of fats and the production of ketone bodies being the main source of energy (after the glycogen reserve has been used) necessary for intensive thermogenesis in the cooled organism [6, 7, 16].

In the group of persons who were exposed to cold a clear inverse dependence was observed between intensification of ketoacidosis and ethanol concentration, which causes an accelerated loss of warmth by an increase of blood flow through skin blood vessels. In ethanol intoxicated persons the speed of the cooling of the organism is therefore probably faster than the speed of adaptation reactions of the system (too small creation of ketone bodies in comparison to needs of the tissue) in a situation where at the same time the above-mentioned anti-ketone action of ethanol is taking place.

A comparison of the results of all determinations in the three examined environments leads to the conclusion that with an appropriately selected analytical method autopsy blood is a good material for determination of ketone bodies, and, (using this information) for the evaluation of metabolic disorders in the period of time prior to death. Evaluations of the results of de-

<sup>3</sup> Maybe this type of metabolic disorder was the cause of death of one chronic alcoholic (no. 30 in Table I), whose reason of the death was not found, but only a significantly increased level of ketone bodies in blood and urine was detected.

<sup>4</sup> This suggestion should be verified on the basis of a greater group of cases than that chosen in our work.

terminations of ketone bodies in urine should, however, be interpreted cautiously, because of the possibility of persisting ketonuria (connected with retention of urine) in cases where ketonemia has already ceased or where there is a lack of ketonuria in a situation of co-existing ketonemia and renal failure (e.g. shock etiology)<sup>5</sup>.

However, it is well known that vitreous humour is a well-isolated environment from other body fluids, and substances present in vitreous humour reach a state of balance with blood circulation *via* passive diffusion. This diffusion from or to the vitreous humour is characterised by some inertia [10]. So, a deduction on the extent of ketoacidosis based only on vitreous humour examination can lead to a false diagnosis in the case, for example, of a rapid rise in ketonemia, which was confirmed by the results of this work. However, in most cases of advanced ketonemia (groups 2 b and 3 in Table I) the concentrations of ketone bodies in vitreous humour turned out to be close to the concentrations in blood, but in cases no. 30 and 36 (Table I)  $\beta$ -HBA concentrations were several times lower than in blood.

#### CONCLUSIONS

1. "By the way" determination of the concentration of free acetone during analysis of the content of ethanol in blood by the gas-chromatography method can only be used as a screening examination for detection of advanced ketoacidosis; it does not allow ketoacidosis to be differentiated from exogenic acetone intoxication.
2. To evaluate the degree of ketoacidosis, it is necessary to determine the concentration of  $\beta$ -HBA or the sum of ketone bodies.
3. Autopsy blood is a good environment for the evaluation of the degree of ketoacidosis in the period of time prior to death.
4. A low concentration of ketone bodies does not exclude the possibility of death as a result of excessive body cooling in cases where a very high concentration of ethanol was determined in the blood.
5. The concentrations of ketone bodies in urine and vitreous humour can significantly differ from the degree of ketonemia at the moment of death.

---

<sup>5</sup> This situation occurred probably in case no. 29 (in Table 1), i.e. in a person who chronically abused alcohol and died as a consequence of a mechanical injury probably after long agony, because *post-mortem* examination showed features of acute circulation-breathing failure and the ketone bodies concentration in urine was low in spite of a high concentration of  $\beta$ -HBA in blood and vitreous humour.

## References:

1. Brinkmann B., Fechner G., Karger B. [et al.], Ketoacidosis and lactic acidosis – frequent causes of death in chronic alcoholics?, *International Journal of Legal Medicine* 1988, vol. 111, pp. 115–119.
2. Caspar C. B., Risti B., Iten P. X. [et al.], Alkoholische Ketoacidose, *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 1993, Bd. 123, S. 1929–1934.
3. Coe J. I., Postmortem chemistry on human vitreous humor, *American Journal of Clinical Pathology* 1969, vol. 51, pp. 741–750.
4. Denmark L. N., The investigation of beta-hydroxybutyrate as a marker for sudden death due to hypoglycemia in alcoholics, *Forensic Science International* 1993, vol. 62, pp. 225–232.
5. Felby S., Nielsen E., Determination of ketone bodies in post-mortem blood by head-space gas chromatography, *Forensic Science International* 1994, vol. 64, pp. 83–88.
6. Helman A., Gilbert M., Pfister-Lemaire N. [et al.], Glucagon and insulin secretion and their biological activities in hypothermic rats, *Endocrinology* 1984, vol. 115, pp. 1772–1778.
7. Hirvonen J., Necropsy findings in fatal hypothermia cases, *Forensic Science* 1976, vol. 8, pp. 155–164.
8. Jenkins D. W., Eckel R. E., Craig J. W., Alcoholic ketoacidosis, *J.A.M.A.* 1971, vol. 217, pp. 177–183.
9. Labib M., Hypoglycaemia, [in:] *Clinical Biochemistry*, Marshall W. J., Bangert S. K. [ed.], Churchill Livingstone, New York 1995.
10. Mądro R., Badania doświadczalne na królikach nad przydatnością równoczesnego oznaczania stężenia alkoholu w ciele szklistym gałki ocznej i we krwi dla pośmiertnej diagnostyki stanu nietrzeźwości, *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii* 1987, t. XXXVII, s. 1–13.
11. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A. [i in.], *Biochemia Harpera*, PZWL, Warszawa 1995.
12. Pawelski S., Maj S., *Normy i diagnostyka chorób wewnętrznych*, PZWL, Warszawa 1993.
13. Pecllet C., Picotte P., Jobin F., The use of vitreous humor levels of glucose, lactic acid and blood levels of acetone to establish antemortem hyperglycemia in diabetics, *Forensic Science International* 1994, vol. 65, pp. 1–6.
14. Pounder D. J., Stevenson R. J., Taylor K. K., Alcoholic ketoacidosis at autopsy, *Journal of Forensic Science* 1988, vol. 43, pp. 812–816.
15. Schneider V., Klug E., Tod durch Unterkühlung, *Zeitschrift für Rechtsmedizin* 1980, Bd. 86, S. 59–69.
16. Shephard R. J., Metabolic adaptations to exercise in the cold. An update, *Sports Medicine* 1993, vol. 16, pp. 266–289.
17. Siegel L., Robin N. I., McDonald L. J., New approach to determination of total ketone bodies in serum, *Clinical Chemistry* 1977, vol. 23, pp. 46–49.
18. Thomsen J. L., Theilade P., Felby S. [et al.], Alcoholism and ketoacidosis, *Forensic Science International* 1993, vol. 60, pp. 3–4.

19. Wachowiak R., Nour Rahnal A., Endogenne lotne związki organiczne we krwi i ich znaczenie sądowo-lekarskie. Cz. 1. Medyczne i toksykologiczne aspekty zatrucia acetonem, *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii* 1994, t. XLIV, s. 263–270.

## **OCENA PRZYDATNOŚCI OZNACZANIA KWASU β-HYDROKSYMASŁOWEGO, KWASU ACETOCTOWEGO ORAZ ACETONU WE KRWI, MOCZU I CIELE SZKLISTYM OKA DO NEKROCHEMICZNEJ DIAGNOSTYKI PRZEDŚMIERTNYCH ZABURZEŃ METABOLICZNYCH\***

Grzegorz TERESIŃSKI, Grzegorz BUSZEWICZ, Roman MAĐRO

### WSTĘP

Kwas acetoctowy (Ac-Ac), kwas β-hydroksymasłowy (β-HBA) i aceton nazywane są zwyczajowo ciałami ketonowymi. Pierwszy etap ich tworzenia przebiega praktycznie tylko w wątrobie (rycina 1), która zawiera odpowiednią liazę uwalniającą Ac-Ac z produktu kondensacji acetylo-CoA (Ac-CoA). Ac-Ac może być redukowany (przy udziale dehydrogenazy β-HBA zależnej od NAD) do β-HBA, z którym pozostaje w równowadze zależnej od potencjału oksyredukcyjnego komórki, a zwłaszcza stosunku NADH/NAD. Natomiast rozkład Ac-Ac do acetonu jest procesem nieenzymatycznym i zachodzi spontanicznie [11].

Ciała ketonowe swobodnie przechodzą przez błony komórkowe i stanowią łatwo przyswajalny substrat energetyczny, utleniany preferencyjnie przed glukozą i kwasami tłuszczowymi. Właściwość ta nabiera dużego znaczenia w stanach głodzenia, kiedy tkanki zależne od glukozy (np. mózg) pokrywają większość swego zapotrzebowania energetycznego ze spalania tych związków [11].

Fizjologiczne stężenie ciał ketonowych we krwi jest bardzo małe, zwykle poniżej 0,2 mmol/l. Ketoza, czyli nagromadzenie się większej ilości tych substancji, może być wynikiem ich zwiększonej produkcji w wątrobie lub zmniejszonego wykorzystania przez tkanki obwodowe. Główną przyczynę hiperketonemii stanowi wewnątrzkomórkowy niedobór glukozy (bezwzględny – spowodowany głodem, wysiłkiem fizycznym na czczo lub względny – związany z niedoborem insuliny, która ułatwia transport glukozy do wnętrza komórek w tkankach pozawątrobowych) i towarzyszący temu nasilony rozkład kwasów tłuszczowych z nadprodukcją Ac-CoA [11]. Podwyższone stężenie Ac-CoA może być ponadto wynikiem nieodpowiedniej diety (bogato-tłuszczowej i ubogowęglowodanowej), nadmiaru antagonistów insuliny (np. w hipotermii) lub zachwiania potencjału oksydacyjno-redukcyjnego komórek (spowodowanego np. brakiem utlenionej formy NAD koniecznej do utylizacji Ac-CoA w cyklu kwasu cytrynowego).

Wytworzone w nadmiarze aniony Ac-Ac i β-HBA usuwane są głównie z moczem w postaci zjonizowanej. Dlatego przedłużająca się ketoza prowadzi do zaburzeń gospodarki wodno-elektrolitowej (tj. utraty jonów sodowych i potasowych po przekrocze-

---

\* Wstępne wyniki tej pracy zaprezentowane zostały podczas XVI Konferencji Toksykologów Sądowych w Kazimierzu Dolnym w dniach 6–7 maja 1999 roku.

niu wydolności mechanizmu amoniogenezy) oraz kwasowo-zasadowej (pod postacią kwasicy metabolicznej). Pamiętać jednak należy, że retencję ciał ketonowych może nasilać dołączająca się niewydolność nerek spowodowana m.in. wstrząsem, zatruciem glikolem etylenowym lub odwodnieniem, np. w wyniku uporczywych wymiotów [1, 9, 11].

Alkohol etylowy jest wprawdzie metabolizowany do Ac-CoA, ale praktycznie nie stanowi substratu do produkcji ciał ketonowych, gdyż utlenianie etanolu do octanu zachodzi prawie wyłącznie w wątrobie, natomiast utlenianie octanu głównie w innych tkankach, które nie mają zdolności do produkcji ciał ketonowych (rycina 1). W jednorazowych dawkach etanol nawet przeciwdziała ketozie (także w hiperglikemii cukrzycowej), prawdopodobnie w wyniku stymulacji uwalniania insuliny po obciążeniu glukozą i pobudzenia dokomórkowego transportu glukozy. Spożycie etanolu może jednak prowadzić do hipoglikemii (pojawiającej się zazwyczaj z kilkunasto-, a nawet kilkudziesięciogodzinnym opóźnieniem), a w związku z nią do wtórnej, czasem nawet śmiertelnej ketozy. Późny efekt hipoglikemizujący etanolu należy tłumaczyć przede wszystkim zmianą potencjału oksyredukcyjnego komórki (wzrostem stosunku NADH/NAD) i zahamowaniem glukoneogenezy (mimo nadmiaru zredukowanego NAD!) na skutek braku substratu do tej reakcji w postaci pirogronianu (który zredukowany jest przez nadmiar NADH do mleczanu) oraz niedożywieniem, które często towarzyszy przewlekłemu spożywaniu alkoholu [1, 2, 4, 8, 9, 11, 14].

Poprzedzający zgon epizod hiperglikemii można wykazać pośmiertnie przez równoczesne oznaczenie stężenia glukozy i kwasu mlekowego, np. w cieple szklistym oka [12]. Pośmiertnie można także rozpoznać cukrzycę przez badanie poziomu glikozylowanej hemoglobiny [1]. Natomiast szybki rozkład glukozy po śmierci [3] sprawia, że przedśmiertną hipoglikemię można diagnozować jedynie pośrednio, np. przez określenie stężenia ciał ketonowych.

Z punktu widzenia potrzeb medycyny sądowej, stężenie ciał ketonowych w materiale pobranym ze zwłok może zatem służyć jako marker wspomnianych wyżej zaburzeń biochemicznych, którym zwykle nie towarzyszą uchwytnie makro- lub mikroskopowo zmiany anatomiczne. Celem niniejszego, wstępnego opracowania, była więc ocena stężeń ciał ketonowych (spośród których aceton można oznaczać metodą chromatografii gazowej „przy okazji” badań w kierunku zawartości alkoholu) w trzech najpowszechniej wykorzystywanych środowiskach (tj. we krwi, moczu i cieple szklistym). Badania przeprowadzono na materiale pobranym ze zwłok osób, które przewlekłe nadużywały alkoholu lub w chwili zgonu znajdowały się w stanie nietrzeźwości, co było uzasadnione omówionym wyżej wpływem alkoholu na ketogenezę oraz dość częstymi przypadkami niewyjaśnionych zgonów wśród alkoholików [18]. Przebadano również materiał pobrany ze zwłok tych osób, których śmierć mogła być skutkiem nadmiernego wychłodzenia ciała. Istniejące obecnie możliwości stwierdzenia, iż śmierć była wynikiem zamarznięcia, są bowiem bardzo ograniczone, gdyż obserwowane zmiany są mało specyficzne (wybroczyny w błonie śluzowej żołądka bądź histologiczne cechy martwicy krwotocznej trzustki, martwicy kardiomiocytów albo zmniejszenie zawartości glikogenu w hepatocytach) lub świadczą jedynie o miejscowym działaniu zimna (odmrożenia, fioletowe zabarwienie okolic kolan i wyrostków łokciowych oraz czerwone zabarwienie plam opadowych), w związku z czym mogą nie występować w przypadkach zgonów z oziębienia w temperaturze otoczenia zbliżonej do zera lub wyższej [7, 15].



## MATERIAŁ

Przebadano próbki krwi, moczu i ciała szklistego pobrane z 36 zwłok (33 mężczyzn i 3 kobiet w wieku od 20 do 73 lat, średni wiek 44 lata, bez wywiadu cukrzycowego<sup>1</sup>) po upływie od 1 do 5 dni od zgonu (średnio około 3 dni). Pominięto te przypadki, w których stwierdzono zaawansowane zmiany autolityczne lub rozpoczynające się zmiany gnilne. Zwłoki do czasu wykonania sekcji były przechowywane w chłodni w temperaturze ok. + 4°C. Pobrany materiał zamrażano.

## METODY

Do analiz użyto NAD (*free acid grade* II, czystość 98%), dehydrogenazę D- $\beta$ -hydroksymasłanową, dehydrogenazę mleczanową i pirogronian sodowy z firmy Boehringer. Za wzorce służyły acetoctan litu, aceton i zestaw roztworów  $\beta$ -HBA z firmy Sigma. Pirogronian przed zastosowaniem został uwolniony od zanieczyszczeń acetonem poprzez rekrytalizację z metanolu.

Aceton, Ac-Ac i  $\beta$ -HBA oznaczano techniką *headspace* chromatografii gazowej według metody opracowanej przez Siegela i in. [17] w modyfikacji Felby'ego i Nielse na [5] przy użyciu chromatografu gazowego Fisons 8160 i autosamplera HS-800. W badanych próbkach oznaczano najpierw wolny aceton, a następnie Ac-Ac (po jego termicznej dekarboksylacji do acetonu) oraz  $\beta$ -HBA (po enzymatycznym utlenieniu do Ac-Ac, a następnie jego termicznej dekarboksylacji do acetonu). NADH wytwarzany podczas utleniania  $\beta$ -HBA przez dehydrogenazę  $\beta$ -hydroksymasłanową był sukcesywnie odtwarzany w wyniku redukcji pirogronianu do mleczanu przez dehydrogenazę mleczanową.

## WYNIKI ANALIZY I DYSKUSJA

Przyjęty sposób postępowania analitycznego wynikał z charakteru materiału pobieranego ze zwłok. Z uwagi na znaczny stopień hemolizy krwi niemożliwe okazało się bowiem zastosowanie fabrycznego zestawu do oznaczania  $\beta$ -HBA firmy Sigma (który pozwala na kolorymetryczne określanie stężenia NADH powstającego w wyniku utlenienia ekwimolarnej ilości acetoctanu), jak również innych metod opartych na kolorymetrycznym oznaczaniu barwnych produktów reakcji acetonu lub acetoctanu z różnymi substancjami (np. nitroprusydkiem sodowym). Do badania materiału pośmiertnego nie nadawała się również metoda chemicznego utleniania  $\beta$ -HBA przy pomocy dwuchromianu potasowego [19], gdyż w tych warunkach do acetonu utleniany jest również izopropanol, który powstaje w wyniku przemian pośmiertnych.

Rezultaty wszystkich oznaczeń stężeń acetonu, Ac-Ac i  $\beta$ -HBA przedstawiono w tabeli I (w  $\mu\text{mol/l}$ ), co umożliwiło łączną ocenę stężeń wszystkich ciał ketonowych, ponieważ zarówno  $\beta$ -HBA, jak i aceton, powstają z Ac-Ac ekwimolarnie. Natomiast osobne oznaczanie stężenia każdej z tych substancji pozwoliło na wykluczenie ewen-

<sup>1</sup> O czym informowały autorów rodziny zmarłych.

tualności egzogenego zatrucia acetonem [19]. W tego rodzaju przypadkach brak jest bowiem Ac-Ac i  $\beta$ -HBA, gdyż reakcja dekarboksylacji Ac-Ac jest nieodwracalna.

Uzyskane wyniki (por. tabela I) w większości oznaczeń nie odbiegały znacznie od stężeń spotykanych zażyciowo u zdrowych osób, tj. poziom  $\beta$ -HBA wynosił poniżej 0,3 mmol/l, zaś suma acetonu i Ac-Ac poniżej 0,2 mmol/l [12]. W niektórych przypadkach okazały się jednak znacznie wyższe.

Dalszą ocenę wyników oznaczeń stężeń ciał ketonowych w trzech przebadanych środowiskach przeprowadzono z uwzględnieniem wyników sekcji zwłok (diagnozy makro- i mikroskopowej) oraz rezultatów badania krwi i moczu w kierunku obecności etanolu, ewentualnie także dalszych badań toksykologicznych. Ponadto brano pod uwagę okoliczności zgonu, które analizowano w oparciu o całość materiałów zawartych w aktach (udostępnionych dzięki uprzejmości prokuratur) oraz informacje uzyskane od rodzin zmarłych osób, które pozwalały na potwierdzenie przewlekłego nadużywania alkoholu i wykluczenie pełnoobjawowej cukrzycy.

Na podstawie tych ustaleń, zbiór 36 przebadanych przypadków podzielono na niżej opisane grupy i podgrupy:

1. Zgony osób, które nie nadużywały przewlekłe alkoholu i nic nie wskazywało na możliwość nadmiernego oziębienia organizmu, z wyodrębnieniem:
  - a) przypadków, w których stwierdzono jedynie wysokie stężenie etanolu (i ewentualnie zmiany chorobowe w obrębie układu krążenia) (n = 7);
  - b) przypadków, w których do zgonu doszło w następstwie urazu lub uduszenia gwałtownego, a ofiara znajdowała się w stanie nietrzeźwości (n = 6);
  - c) pozostałych zgonów osób, które nie znajdowały się w stanie nietrzeźwości (n = 8).
2. Zgony osób, które przewlekłe nadużywały alkoholu<sup>2</sup>, ale nic nie wskazywało na możliwość nadmiernego oziębienia organizmu, z wyodrębnieniem:
  - a) przypadków, w których stwierdzono jedynie wysokie (> 4‰) stężenie etanolu (n = 3),
  - b) pozostałych przypadków zgonów (n = 6).
3. Zgony, w których okoliczności znalezienia zwłok oraz wynik badania pośmiertnego wskazywały na możliwość nadmiernego ochłodzenia ciała (n = 6).

Pominięto ocenę ewentualnego wpływu czasu, jaki upłynął od chwili zgonu do przeprowadzenia sekcji zwłok, ponieważ z wcześniejszych doniesień wynika, że wytwarzanie ciał ketonowych w toku przemian pośmiertnych nie ma istotnego znaczenia w ciągu pierwszych 5 dni od śmierci [1].

Rycina 2 przedstawia wyniki oznaczeń acetonu, Ac-Ac i  $\beta$ -HBA oraz sumy stężeń wszystkich tych ciał ketonowych we krwi, moczu i cieple szklistym z uwzględnieniem podanego wyżej podziału analizowanego materiału sekcyjnego. Przypadki zostały uporządkowane w poszczególnych grupach i podgrupach według wzrastających stężeń ogólnej zawartości ciał ketonowych we krwi. Ponadto na rycinie 2 zaznaczono dodatkowo stężenia etanolu we krwi i moczu.

Z przedstawionych wykresów wynika, że najlepszym markerem ketozy jest stężenie  $\beta$ -HBA, które praktycznie determinuje poziom ciał ketonowych. Natomiast

<sup>2</sup> We wszystkich przypadkach zakwalifikowanych do tej grupy stwierdzono stłuszczenie lub marskość wątroby.

stężenia acetonu, a zwłaszcza Ac-Ac, mogą kształtować się na niskim poziomie nawet przy wyraźnie podwyższonym stężeniu  $\beta$ -HBA. Te komercyjne testy kliniczne, które wykrywają jedynie Ac-Ac, mogą więc w części przypadków dawać wyniki fałszywie ujemne, przez co mają ograniczoną wartość diagnostyczną.

Wykrycie podwyższonego stężenia acetonu jest możliwe „przy okazji” analizy krwi, moczu i ciała szklanego w kierunku obecności etanolu. W związku z tym to rutynowe postępowanie jest zarazem badaniem przesiewowym wskazującym na bardzo zaawansowany stopień ketozy i celowość oznaczenia poziomu  $\beta$ -HBA, gdyż (jak to wynika z ryciny 2) wyraźny wzrost stężenia acetonu (pochodzącego z przemian metabolicznych) towarzyszy dopiero wysokim stężeniom  $\beta$ -HBA.

Rozbieżność pomiędzy stężeniem  $\beta$ -HBA a stężeniami Ac-Ac i acetonu jest szczególnie wyraźna (zwłaszcza we krwi i ciele szklanym oka) w grupie osób przewlekłe nadużywających alkoholu. Prawdopodobnie tę należy tłumaczyć zmianą potencjału oksydującego komórek wątroby „zajętych” spalaniem etanolu (tj. wzrostem stosunku NADH/NAD). Retencja Ac-Ac jest więc utrudniona, ponieważ jest on konwertowany do  $\beta$ -HBA, który w tej sytuacji nie może ulegać dekarboksylacji do acetonu.

U osób, które zmarły w wyniku ostrego zatrucia alkoholem (nawet jeżeli spożywały go wcześniej w sposób przewlekły) oraz w przypadkach nagłych zgonów (z innych, znanych przyczyn z wyjątkiem hipotermii) osób znajdujących się w stanie nietrzeźwości, które wcześniej nie nadużywały przewlekłe alkoholu, stężenie ciał ketonowych było niskie – zbliżone do normy fizjologicznej za życia. W przypadkach ostrej intoksykacji etanolem nie dochodzi zatem do wzrostu ketogenezy, gdyż komórki wątrobowe „zajęte” utylizacją etanolu nie kumulują większej ilości Ac-CoA, stanowiącym substrat do ketogenezy (wzrost stosunku NADH/NAD podczas spalania etanolu hamuje  $\beta$ -oksydację kwasów tłuszczowych, a powstający octan jest aktywowany do Ac-CoA głównie w tkankach pozawątrobowych, które nie mają zdolności do produkcji ciał ketonowych). Dopiero przedłużająca się intoksykacja etanolem w połączeniu ze spadkiem stężenia glukozy we krwi (w wyniku reaktywnej hipoglikemii spowodowanej etanolem, zahamowania glukoneogenezy w związku z kwasimą mleczanową lub (i) nieprzyjmowania posiłków zawierających węglowodany) może prowadzić do hiperketonemii (i kwasicy ketonowej) w wyniku aktywacji hormonów o działaniu przeciwnym do insuliny, nasilonego rozkładu trójglicerydów oraz wzrostu stężenia wolnych kwasów tłuszczowych i Ac-CoA, który nie może wejść do cyklu kwasu cytrynowego (m.in. z uwagi na brak szczawiooctanu powstającego z rozkładu glukozy)<sup>3</sup>.

Największe stężenia ciał ketonowych w badanej grupie wystąpiły jednak w tych przypadkach, w których nie stwierdzono etanolu w płynach ustrojowych, a okoliczności wskazywały, że przyczyną śmierci mogło być nadmierne ochłodzenie organizmu. Świadczy to o tym, że wysokie stężenie ciał ketonowych traktować można jako test diagnostyczny śmierci spowodowanej hipotermią<sup>4</sup>. Hipotermia prowadzi bo-

<sup>3</sup> Być może tego rodzaju zaburzenia metaboliczne przyczyniły się do zgonu jednej z osób przewlekłe nadużywającej alkoholu (pozycja nr 30 w tabeli I), u której nie stwierdzono uchwytnej przyczyny śmierci, a jedynie znacznie podwyższony poziom ciał ketonowych we krwi i moczu.

<sup>4</sup> Wniosek ten wymaga jednak weryfikacji na podstawie większej grupy przypadków dobranych podobnie jak w niniejszej pracy.

wiem (podobnie jak inne „stresory”) do wzmożonego uwalniania hormonów o działaniu przeciwnym do insuliny (początkowo głównie katecholamin, następnie glukagonu i kortykosterydów), które nasilają rozpad tłuszczów i produkcję ciał ketonowych stanowiących podstawowe źródło energii (po zużyciu zapasów glikogenu) niezbędnej do wzmożonej termogenezy w oziębianym organizmie [6, 7, 16].

W grupie osób poddanych ekspozycji na zimno uwidoczniła się przy tym wyraźna odwrotna zależność między nasileniem ketozy a stężeniem etanolu, który powoduje przyspieszoną utratę ciepła dzięki wzmożonemu przepływowi krwi przez naczynia skórne. U osób zatrutych etanolem tempo wyziębienia organizmu przekracza zatem prawdopodobnie szybkość reakcji adaptacyjnych ustroju (zbyt mała produkcja ciał ketonowych w stosunku do zapotrzebowania tkanek) w sytuacji, gdy jednocześnie ma miejsce omówione wcześniej przeciwketonemiczne działanie etanolu.

Porównanie wyników wszystkich oznaczeń w trzech badanych środowiskach prowadzi do wniosku, że przy odpowiednio dobranej metodzie analitycznej krew sekcyjna stanowi dobry materiał do oznaczenia ciał ketonowych i oceny na tej podstawie zaburzeń metabolicznych w okresie poprzedzającym zgon. Ocena wyników oznaczeń ciał ketonowych w moczu powinna być natomiast ostrożna z uwagi na możliwość utrzymywania się ketonurii (w związku z retencją moczu) w tych przypadkach, w których doszło już do ustąpienia ketonemii lub też braku ketonurii w sytuacji współistnienia ketonemii i niewydolności nerek (np. o etiologii wstrząsowej)<sup>5</sup>.

Natomiast o cieple szklistym wiadomo, że jest środowiskiem dobrze izolowanym od innych płynów ustrojowych, a zawarte w nim substancje osiągają stan równowagi z krwioobiegami na drodze biernej dyfuzji. Proces przechodzenia różnych substancji z lub do ciała szklistego cechuje zatem pewna inercja [10]. Oparcie wnioskowania o stopniu zaawansowania ketozy jedynie na wynikach badania ciała szklistego może więc prowadzić do błędnej diagnozy, np. w razie szybko narastającej ketonemii, co potwierdzają wyniki tej pracy. W większości przypadków nasilonej ketonemii (grupy 2 b i 3 w tabeli I) stężenie ciał ketonowych w cieple szklistym okazało się wprawdzie zbliżone do stężenia ciał ketonowych we krwi, ale jednak w przypadkach nr 30 i 36 (tabela I) stężenie  $\beta$ -HBA w cieple szklistym było wielokrotnie niższe niż we krwi.

#### WNIOSKI

1. Stężenie wolnego acetonu oznaczone „przy okazji” badania krwi na zawartość etanolu metodą chromatografii gazowej może służyć jedynie jako badanie przesiewowe do wykrywania bardzo zaawansowanej ketozy, ale nie pozwala na różnicowanie ketozy od egzogennej zatrucia acetonem.
2. Do oceny stopnia nasilenia ketozy konieczne jest oznaczenie stężenia  $\beta$ -HBA lub sumy ciał ketonowych.

<sup>5</sup> Sytuacja taka wystąpiła prawdopodobnie w przypadku nr 29 (w tabeli I), tj. u osoby, która nadużywała przewlekłe alkoholu i zmarła w następstwie urazu mechanicznego prawdopodobnie po dłuższej agonii, gdyż badanie pośmiertne wykazało cechy ostrej niewydolności krążeniowo-oddechowej, a stężenie ciał ketonowych w moczu było niskie pomimo wysokich stężeń  $\beta$ -HBA we krwi i cieple szklistym.

3. Krew sekcyjna stanowi dobre środowisko do oceny stopnia zaawansowania ketozy w okresie poprzedzającym zgon.
4. Niskie stężenie ciał ketonowych nie wyklucza możliwości zgonu w wyniku nadmiernego ochłodzenia organizmu wtedy, gdy we krwi zmarłego stwierdzono bardzo wysokie stężenie etanolu.
5. Stężenia ciał ketonowych w moczu i w ciecie szklistym mogą nawet znacznie odbiegać od poziomu ketonemii w chwili zgonu.